

MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):

(19) 【発行国】 日本国特許庁 (J P)	(19)[ISSUING COUNTRY] Japan Patent Office (JP)
(12) 【公報種別】 公開特許公報 (A)	(12)[GAZETTE CATEGORY] Laid-open Kokai Patent (A)
(11) 【公開番号】 特開平 8-59686	(11)[KOKAI NUMBER] Unexamined Japanese Patent Heisei 8-59686
(43) 【公開日】 平成 8 年 (1 9 9 6) 3 月 5 日	(43)[DATE OF FIRST PUBLICATION] March 5 (1996. 3.5), Heisei 8
(54) 【発明の名称】 ウミホタルルシフェリン誘導体 および糖加水分解酵素の定量方 法	(54)[TITLE OF THE INVENTION] The quantitative method of a cypridina-luciferin derivative and a saccharide hydrolase
(51) 【国際特許分類第 6 版】 C07H 17/02 C07D487/04 144 7019-4C C12Q 1/34 6807-4B	(51)[IPC 6] C07H 17/02 C07D487/04 144 7019-4C C12Q 1/34 6807-4B
G01N 21/78 C	G01N 21/78 C
【審査請求】 未請求	[REQUEST FOR EXAMINATION] No
【請求項の数】 5	[NUMBER OF CLAIMS] 5
【出願形態】 O L	[FORM OF APPLICATION] Electronic

【全頁数】 8	[NUMBER OF PAGES] 8
(21) 【出願番号】 特願平 6-198770	(21) [APPLICATION NUMBER] Japanese Patent Application Heisei 6-198770
(22) 【出願日】 平成 6 年 (1 9 9 4) 8 月 2 3 日	(22) [DATE OF FILING] August 23 (1994. 8.23), Heisei 6
(71) 【出願人】	(71) [PATENTEE/ASSIGNEE]
【識別番号】 000004341	[ID CODE] 000004341
【氏名又は名称】 日本油脂株式会社	[NAME OR APPELLATION] Nippon Oil & Fats Co., Ltd.
【住所又は居所】 東京都渋谷区恵比寿四丁目 2 0 番 3 号	[ADDRESS OR DOMICILE]
(72) 【発明者】	(72) [INVENTOR]
【氏名】 三谷 元宏	[NAME OR APPELLATION] Mitani, Motohiro
【住所又は居所】 茨城県つくば市梅園 2 - 2 4 - 5	[ADDRESS OR DOMICILE]
(72) 【発明者】	(72) [INVENTOR]
【氏名】 榊 秀次郎	[NAME OR APPELLATION] Sakaki, Syujiro
【住所又は居所】	[ADDRESS OR DOMICILE]

茨城県つくば市春日 2 - 2 0 -
3

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

[NAME OR APPELLATION]

鯉沼 康美

Koinuma, Yasumi

【住所又は居所】

[ADDRESS OR DOMICILE]

茨城県つくば市東新井 3 2 - 1
6

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

[NAME OR APPELLATION]

戸谷 義明

Todani, Yoshiaki

【住所又は居所】

[ADDRESS OR DOMICILE]

愛知県刈谷市井ヶ谷町広沢 1

(74) 【代理人】

(74)[AGENT]

【弁理士】

[PATENT ATTORNEY]

【氏名又は名称】

[NAME OR APPELLATION]

柳原 成

Yanagihara, Naru

(57) 【要約】

(57)[ABSTRACT OF THE DISCLOSURE]

【目的】

[PURPOSE]

α -D-ガラクトシダーゼ等の糖加水分解酵素の基質として利用して発光させることができ、糖加水分解酵素の定量に利用することができる新規かつ有

It obtains a new and useful cypridina-luciferin derivative which is utilized as a substrate of saccharide hydrolases, such as a (alpha)-D-galactosidase, to make light emit, and which can be utilized for the quantum of a

用なウミホタルルシフェリン誘導体を得る。 saccharide hydrolase.

【構成】

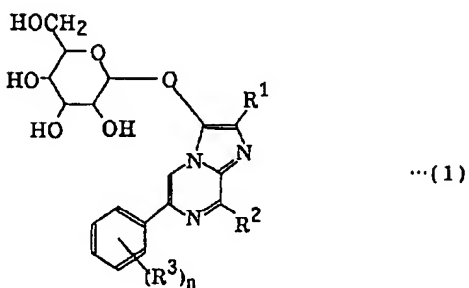
下記一般式（１）で表わされるウミホタルルシフェリン誘導体。

[CONSTITUTION]

Cypridina-luciferin derivative expressed with the following general formula (1).

【化１】

[FORMULA 1]



(R¹およびR²は水素、炭素数 1～20のアルキル基、炭素数 6～20のアリール基または炭素数 7～19のアリーラルキル基。R³は炭素数 1～5のアルキル基またはアルコキシ基。nは0～5の整数。)

(R¹ and R² are hydrogen, a C1-C20 alkyl group, a C6-C20 aryl group, or a C7-C19 arylalkyl group.

R³ is a C1-C5 alkyl group or an alkoxy group.

N is an integer between 0 to 5.)

【特許請求の範囲】

[CLAIMS]

【請求項１】

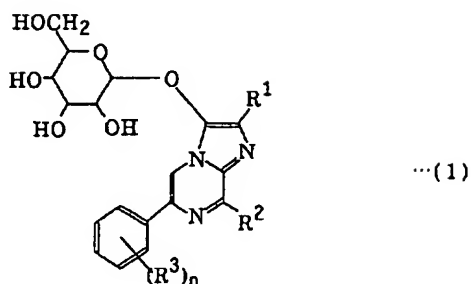
下記一般式（１）で表わされるウミホタルルシフェリン誘導体。

[CLAIM 1]

Cypridina-luciferin derivative expressed with the following general formula (1).

【化１】

[FORMULA 1]



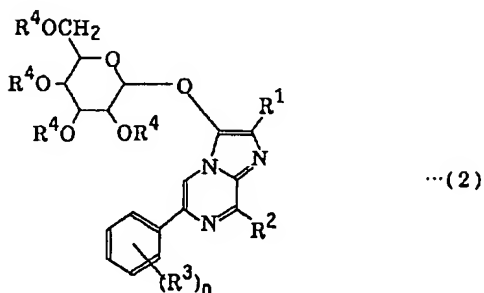
(式中、 R^1 および R^2 はそれぞれ (In the Formula, R^1 and R^2 indicate a hydrogen atom, a C1-C20 alkyl group, a C6-C20 aryl group, or a C7-C19 arylalkyl group respectively and independently.
 R^3 indicates a C1-C5 alkyl group or an alkoxy group, and n indicates an integer from 0 to 5.)
 れ独立に水素原子、炭素数 1 ～ 20 のアルキル基、炭素数 6 ～ 20 のアリール基または炭素数 7 ～ 19 のアリールアルキル基を示す。 R^3 は炭素数 1 ～ 5 のアルキル基またはアルコキシ基、n は 0 ～ 5 の整数を示す。)

【請求項 2】

下記一般式 (2) で表わされるウミホタルルシフェリン中間体。

[CLAIM 2]

The cypridina-luciferin intermediate expressed with the following general formula (2).

【化 2】**[FORMULA 2]**

(式中、 R^1 および R^2 はそれぞれ独立に水素原子、炭素数1～20のアルキル基、炭素数6～20のアリール基または炭素数7～19のアリールアルキル基を示す。 R^3 は炭素数1～5のアルキル基またはアルコキシ基、 n は0～5の整数を示す。 R^4 は炭素数1～7のアシル基を示す。)

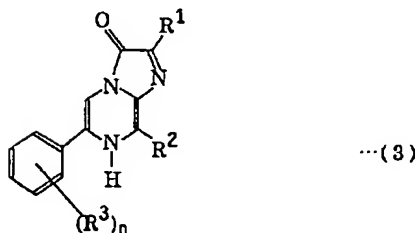
(In the Formula, R^1 and R^2 indicate a hydrogen atom, a C1-C20 alkyl group, a C6-C20 aryl group, or a C7-C19 arylalkyl group independently and respectively.

R^3 indicates a C1-C5 alkyl group or an alkoxy group, and n indicates an integer from 0 to 5. R^4 indicates a C1-C7 acyl group.)

【請求項3】 一般式(3) [CLAIM 3] General formula (3)

【化3】

[FORMULA 3]



(式中、 R^1 および R^2 はそれぞれ独立に水素原子、炭素数1～20のアルキル基、炭素数6～20のアリール基または炭素数7～19のアリールアルキル基を示す。 R^3 は炭素数1～5のアルキル基またはアルコキシ基、 n は0～5の整数を示す。)で表わされるイミダゾピラジン誘導体と、一般式(4)

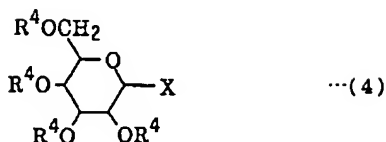
(In the Formula, R^1 and R^2 show a hydrogen atom, a C1-C20 alkyl group, a C6-C20 aryl group, or a C7-C19 arylalkyl group independently, respectively.

R^3 indicates a C1-C5 alkyl group or an alkoxy group, and n indicates an integer from 0 to 5.)

The imidazo pyrazine derivative expressed by the above, and General formula (4)

【化 4】

[FORMULA 4]

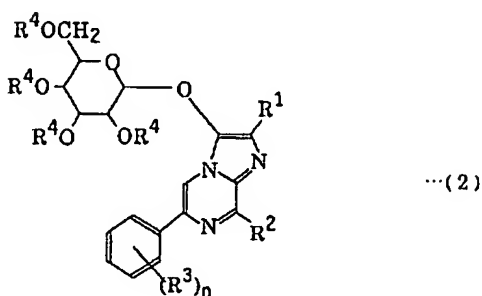


(式中、Xはハロゲン原子、R⁴は炭素数1～7のアシル基を示す。)で表わされる糖誘導体とを、トルフルオロメタンスルホン酸銀およびリン酸二ナトリウム塩の存在下に反応させて、一般式(2)

It makes the sugar derivative object expressed with (X shows a halogen atom and in the Formula R⁴ shows a C1-C7 acyl group) react in the presence of Torr fluoro methanesulfonic acid silver and phosphoric-acid disodium salt. General formula (2)

【化 5】

[FORMULA 5]



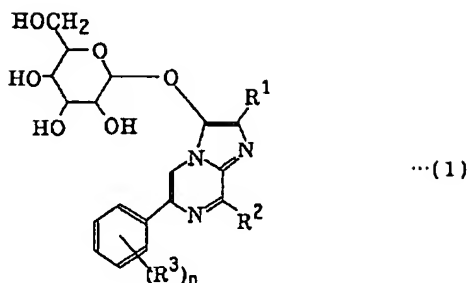
(式中、R¹～R⁴およびnは上記と同じものを示す。)で表わされるウミホタルルシフェリン中間体を製造した後、アルカリ存在下に加溶媒分解することを特徴とする一般式(1)

After manufacturing the cypridina-luciferin intermediate expressed with (in the Formula R¹-R⁴ and n show the same thing as the above), it carries out the solvolysis in the presence of an alkali.

General formula (1) characterized by the above-mentioned

【化 6】

[FORMULA 6]



(式中、 $R^1 \sim R^3$ および n は上記と同じものを示す。) で表わされるウミホタルルシフェリン誘導体の製造方法。

It is a manufacturing method of the cypridina-luciferin derivative expressed with (in the Formula $R^1 \sim R^3$ and n show the same thing as the above).

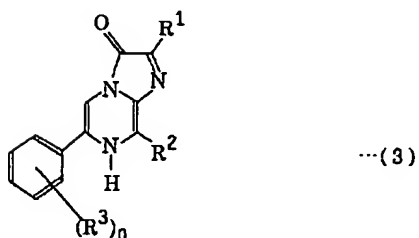
【請求項 4】

一般式 (3)

[CLAIM 4] General formula (3)

【化 7】

[FORMULA 7]



(式中、 R^1 および R^2 はそれぞれ独立に水素原子、炭素数 1 ～ 20 のアルキル基、炭素数 6 ～ 20 のアリール基または炭素数 7 ～ 19 のアリールアルキル基

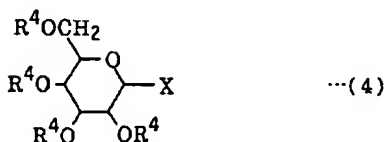
(In the Formula, R^1 and R^2 show a hydrogen atom, a C1-C20 alkyl group, a C6-C20 aryl group, or a C7-C19 arylalkyl group independently, respectively. R^3 indicates a C1-C5 alkyl group or an alkoxy

を示す。R³は炭素数1～5のアルキル基またはアルコキシ基、nは0～5の整数を示す。)で表わされるイミダゾピラジン誘導体と、一般式(4)

group, and n indicates an integer from 0 to 5.) The imidazo pyrazine derivative expressed by the above, and General formula (4)

【化8】

[FORMULA 8]

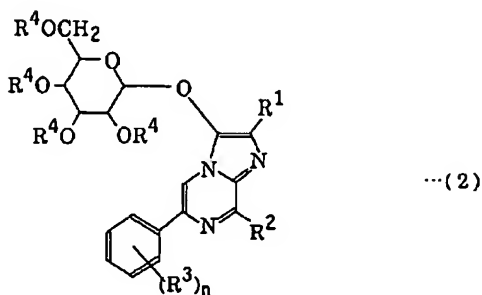


(式中、Xはハロゲン原子、R⁴は炭素数1～7のアシル基を示す。)で表わされる糖誘導体とを、トルフルオロメタンスルホン酸銀およびリン酸二ナトリウム塩の存在下に反応させることを特徴とする一般式(2)

It makes the sugar derivative object expressed with (X shows a halogen atom and in the Formula R⁴ shows a C1-C7 acyl group) react in the presence of Torr fluoro methanesulfonic acid silver and phosphoric-acid disodium salt. General formula (2) characterized by the above-mentioned

【化9】

[FORMULA 9]



(式中、R¹～R⁴およびnは上

It is a manufacturing method of the

記と同じものを示す。)で表わされるウミホタルルシフェリン中間体の製造方法。

cypridina-luciferin intermediate expressed with (in the Formula R^1 - R^4 and n show the same thing as the above).

【請求項 5】

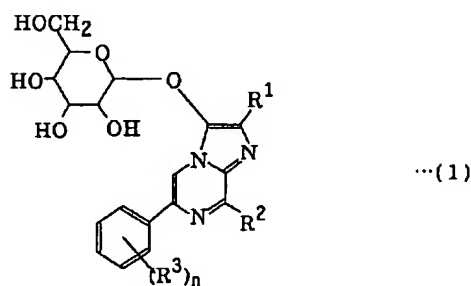
糖加水分解酵素によりウミホタルルシフェリン誘導体が分解されることによって発光する発光量を測定することにより糖加水分解酵素の酵素量を定量する方法であって、ウミホタルルシフェリン誘導体として下記一般式(1)で表わされるウミホタルルシフェリン誘導体を使用することを特徴とする糖加水分解酵素の定量方法。

[CLAIM 5]

A quantitative method of the saccharide hydrolase, which is the procedure of assaying the amount of enzymes of a saccharide hydrolase by measuring the amount of luminescence which emits light by disassembling the cypridina-luciferin derivative with a saccharide hydrolase, comprised such that it uses the cypridina-luciferin derivative expressed with the following general formula (1) as cypridina-luciferin derivative.

【化 10】

[FORMULA 10]



(式中、 R^1 および R^2 はそれぞれ独立に水素原子、炭素数 1～20 のアルキル基、炭素数 6～20 のアリール基または炭素数 7～19 のアリールアルキル基を示す。 R^3 は炭素数 1～5 のアルキル基またはアルコキシ基、

(In the Formula)

R^1 and R^2 show a hydrogen atom, a C1-C20 alkyl group, a C6-C20 aryl group, or a C7-C19 arylalkyl group independently, respectively. As for R^3 , a C1-C5 alkyl group or an alkoxy group, and n show the integer of 0-5.

nは0～5の整数を示す。)

【発明の詳細な説明】**[DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION]****【0001】****[0001]****【産業上の利用分野】****[INDUSTRIAL APPLICATION]**

本発明は、新規かつ有用なウミホタルルシフェリン誘導体、その中間体、これらの製造方法、およびウミホタルルシフェリン誘導体を発光基質として用いた糖加水分解酵素の定量方法に関する。

This invention relates to the new and useful cypridina-luciferin derivative, its intermediate, these manufacturing methods, and the quantitative method of the saccharide hydrolase using the cypridina-luciferin derivative as a luminescence matrix.

【0002】**[0002]****【従来技術】****[PRIOR ART]**

抗原抗体反応に基づくイムノアッセイの分野において、ラジオイムノアッセイに代わる分析手段として化学発光酵素イムノアッセイが注目されている。化学発光酵素イムノアッセイは、酵素が化学結合している抗体または抗原を用いて、基質となる化学発光物質を定量することによって、その抗体または抗原の量を測定する方法である。

In the field of the immunoassay based on an antigen antibody reaction, the chemoluminescence enzyme immunoassay attracts attention as tools of analysis which it replaces with a radioimmunoassay.

A chemoluminescence enzyme immunoassay is the procedure of measuring the quantity of the antibody or an antigen by assaying the chemoluminescence matter with which an enzyme serves as a matrix using the antibody or antigen which is carrying out the chemical bond.

【0003】**[0003]**

化学発光酵素イムノアッセイに用いられ、酵素反応により発光

It is used for a chemoluminescence enzyme immunoassay, as a matrix (luminescence

する基質（発光基質）としては、ルミノール誘導体、シュウ酸エステル、アダマンチルジオキセタン誘導体などが知られている。これらの中でアダマンチルジオキセタン誘導体は β -D-ガラクトシダーゼの基質として利用され、発光量を測定することにより β -D-ガラクトシダーゼ量を定量することができる（特開平2-180893号）。しかしながら、アダマンチルジオキセタン誘導体は分子内に過酸化物構造を有しているので、光および熱による分解や、金属との反応によるレドックス分解を引き起こし易く、このため定量分析の誤差を招きやすいという問題点がある。

【0004】

ところで、これまでに知られているウミホタルルシフェリン誘導体は、一重項酸素、スーパーオキシドアニオン、ヒドロキシルラジカル等の活性酸素と選択的に反応して発光することから、これら活性酸素の微量定量に有効であることが知られている。しかしながら β -D-ガラクトシダーゼなどの糖加水分解酵素の基質として用いても発光しない。また本発明のウミホタルルシフェリン誘導体と類似した構造を有するセレンテラジングルクロニドが知られている

matrix) which emits light by an enzyme reaction, the luminol derivative, oxalate, the adamantyl dioxatane derivative, etc. are known.

The adamantyl dioxatane derivative is utilized as a matrix of a (beta)-D-galactosidase in these, it can assay the amount of (beta)-D-galactosidases by measuring the amount of luminescence (Unexamined-Japanese-Patent No. 2-180893). However, the adamantyl dioxatane derivative has the peroxide structure in the molecule, depend.

It is easy to cause the degradation by the light and heat, and the redox degradation by reaction with a metal, and there is a trouble of being easy to cause the error of quantitative analysis for this reason.

[0004]

By the way, since the cypridina-luciferin derivative known until now reacts alternatively with active oxygens, such as singlet oxygen, a spur oxide anion, and a hydroxyl radical, and light is emitted, it is known that it is effective in the microestimation of a these active oxygen. However, even if it uses as a matrix of saccharide hydrolases, such as a (beta)-D-galactosidase, it does not emit light. Moreover, it is although the coelenterazine glucuronide which has the cypridina-luciferin derivative of this invention and the similar structure is known (Chem.Latt.417-8 (1987)), since this compound emits light only with a special enzyme called a glucuronidase, it is not

(Chem. Latt. 417-8(1987)) が、この化合物はグルクロニダーゼという特殊な酵素でのみ発光するため、 β -D-ガラクトシダーゼなどの糖加水分解酵素の定量に利用することはできない。このため発光を利用して、糖加水分解酵素を高精度で定量することができる発光基質の開発が強く望まれている。

applicable to the assay of saccharide hydrolases, such as a (beta)-D-galactosidase. For this reason, it utilizes luminescence, development of the luminescence matrix which is highly accurate and can assay a saccharide hydrolase is desired strongly.

【 0 0 0 5 】**[0005]****【発明が解決しようとする課題】****[PROBLEM TO BE SOLVED BY THE INVENTION]**

本発明の目的は、糖加水分解酵素に対する基質として利用して発光させることができ、糖加水分解酵素の定量に利用することができる新規かつ有用なウミホタルルシフェリン誘導体、およびその中間体を提供することである。本発明の他の目的は、上記ウミホタルルシフェリン誘導体を簡単に効率よく製造することができるウミホタルルシフェリン誘導体の製造方法、および中間体の製造方法を提案することである。本発明の別の目的は、上記ウミホタルルシフェリン誘導体を利用して、高い精度で酵素量を定量することができる糖加水分解酵素の定量方法を提案することである。

Objective of the invention is offering the new and useful cypridina-luciferin derivative which can utilize as a matrix with respect to a saccharide hydrolase, and it can make emit light, and can be utilized for the assay of a saccharide hydrolase, and its intermediate.

The other objective of this invention is to propose the manufacturing method of the cypridina-luciferin derivative which can manufacture the above-mentioned cypridina-luciferin derivative efficiently easily, and the manufacturing method of an intermediate.

Another objective of this invention utilizes the above-mentioned cypridina-luciferin derivative, it is proposing the quantitative method of the saccharide hydrolase which can assay the amount of enzymes in high accuracy.

【 0 0 0 6 】**[0006]**

【課題を解決するための手段】

本発明は次のウミホタルルシフェリン誘導体、その中間体、これらの製造方法、およびウミホタルルシフェリン誘導体を発光基質として用いた糖加水分解酵素の定量方法である。

(1) 下記一般式(1)で表わされるウミホタルルシフェリン誘導体。

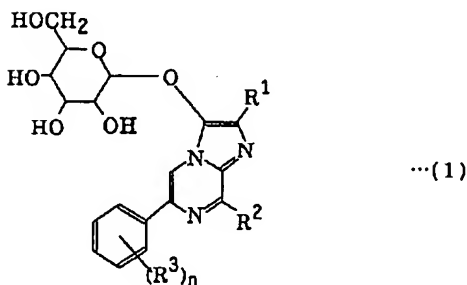
[MEANS TO SOLVE THE PROBLEM]

This invention is the following cypridina-luciferin derivative, its intermediate, these manufacturing methods, and the quantitative method of a saccharide hydrolase that used the cypridina-luciferin derivative as a luminescence matrix.

(1) Cypridina-luciferin derivative expressed with the following general formula (1).

【化 1 1】

[FORMULA 11]



(式中、 R^1 および R^2 はそれぞれ独立に水素原子、炭素数1～20のアルキル基、炭素数6～20のアリール基または炭素数7～19のアリールアルキル基を示す。 R^3 は炭素数1～5のアルキル基またはアルコキシ基、 n は0～5の整数を示す。)

(2) 下記一般式(2)で表わされるウミホタルルシフェリン中間体。

(In the Formula)

R^1 and R^2 show a hydrogen atom, a C1-C20 alkyl group, a C6-C20 aryl group, or a C7-C19 arylalkyl group independently, respectively.

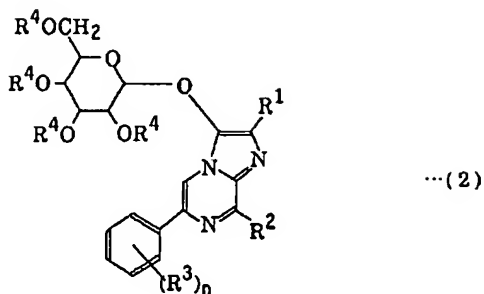
As for R^3 , a C1-C5 alkyl group or an alkoxy group, and n show the integer of 0-5.

(2) The cypridina-luciferin intermediate expressed with the following general formula

(2).

【化 12】

[FORMULA 12]

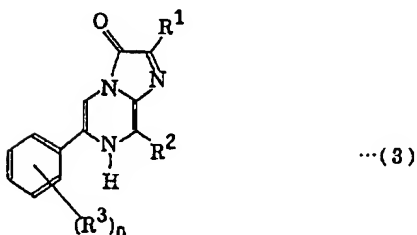


(式中、 R^1 および R^2 はそれぞれ (In the Formula)
 れ独立に水素原子、炭素数 1 ～ R^1 and R^2 show a hydrogen atom, a C1-C20
 20 のアルキル基、炭素数 6 ～ alkyl group, a C6-C20 aryl group, or a C7-C19
 20 のアリール基または炭素数 arylalkyl group independently, respectively.
 7 ～ 19 のアリールアルキル基 As for R^3 , a C1-C5 alkyl group or an alkoxy
 を示す。 R^3 は炭素数 1 ～ 5 のア group, and n show the integer of 0-5.
 ルキル基またはアルコキシ基、 R^4 shows a C1-C7 acyl group.
 n は 0 ～ 5 の整数を示す。 R^4 (3) General formula (3)
 は炭素数 1 ～ 7 のアシル基を示す。)

(3) 一般式 (3)

【化 13】

[FORMULA 13]



(式中、 R^1 および R^2 はそれぞれ (In the Formula)

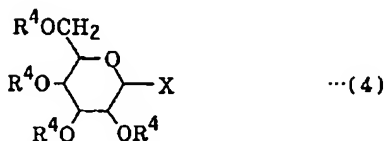
れ独立に水素原子、炭素数 1 ～ 20 のアルキル基、炭素数 6 ～ 20 のアリール基または炭素数 7 ～ 19 のアリールアルキル基を示す。R³ は炭素数 1 ～ 5 のアルキル基またはアルコキシ基、n は 0 ～ 5 の整数を示す。) で表わされるイミダゾピラジン誘導体と、一般式 (4)

R¹ and R² show a hydrogen atom, a C1-C20 alkyl group, a C6-C20 aryl group, or a C7-C19 arylalkyl group independently, respectively.

R³ indicates a C1-C5 alkyl group or an alkoxy group, and n indicates an integer from 0 to 5.) The imidazo pyrazine derivative expressed by the above, and General formula (4)

【化 14】

[FORMULA 14]



(式中、Xはハロゲン原子、R⁴ は炭素数 1 ～ 7 のアシル基を示す。) で表わされる糖誘導体とを、トリフルオロメタンスルホン酸銀およびリン酸二ナトリウム塩の存在下に反応させて、前記一般式 (2) で表わされるウミホタルルシフェリン中間体を製造した後、アルカリ存在下に加溶媒分解することを特徴とする前記一般式 (1) で表わされるウミホタルルシフェリン誘導体の製造方法。

(4) 前記一般式 (3) で表わされるイミダゾピラジン誘導体と、前記一般式 (4) で表わされる糖誘導体とを、トリフルオ

It makes the sugar derivative object expressed with (X shows a halogen atom and in the Formula R⁴ shows a C1-C7 acyl group) react in the presence of Torr fluoro methanesulfonic acid silver and phosphoric-acid disodium salt.

After manufacturing the cypridina-luciferin intermediate expressed with said General formula (2), it carries out the solvolysis in the presence of an alkali.

The manufacturing method of the cypridina-luciferin derivative expressed with said General formula (1) characterized by the above-mentioned.

(4) Make the imidazo pyrazine derivative expressed with said General formula (3), and the sugar derivative object expressed with said General formula (4) react in the presence of

ロメタンスルホン酸銀およびリン酸二ナトリウム塩の存在下に反応させることを特徴とする前記一般式(2)で表わされるウミホタルルシフェリン中間体の製造方法。

(5) 糖加水分解酵素によりウミホタルルシフェリン誘導体が分解されることによって発光する発光量を測定することにより糖加水分解酵素の酵素量を定量する方法であって、ウミホタルルシフェリン誘導体として前記一般式(1)で表わされるウミホタルルシフェリン誘導体を使用することを特徴とする糖加水分解酵素の定量方法。

trifluoro methanesulfonic acid silver and phosphoric-acid disodium salt.

The manufacturing method of the cypridina-luciferin intermediate expressed with said General formula (2) characterized by the above-mentioned.

(5) It is the procedure of assaying the amount of enzymes of a saccharide hydrolase by measuring the amount of luminescence which emits light by disassembling the cypridina-luciferin derivative with a saccharide hydrolase, comprised such that it uses the cypridina-luciferin derivative expressed with said General formula (1) as cypridina-luciferin derivative.

The quantitative method of the saccharide hydrolase characterized by the above-mentioned.

【0007】

一般式(1)において、 R^1 または R^2 で示される基の具体的なものとしては、例えばメチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*t*-ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、トリデシル基、ヘキサデシル基、イコシル基等の直鎖状または分岐鎖状の炭素数1～20のアルキル基；フェニル基、ナフチル基、アントリル基、フェナントリル基、ナфтаセニル基、ピレニル基、ペリレニル基等の炭素数6～20のアリー

[0007]

In General formula (1), as the specific thing of the group shown by R^1 or R^2 , for example, a methyl group, an ethyl group, *n*-propyl group, an isopropyl group, *n*-butyl group, linear or branched C1-C20 alkyl groups, such as an isobutyl group, *t*-butyl group, a pentyl group, a hexyl group, a heptyl group, an octyl group, a nonyl group, a decyl group, a tri-decyl group, a hexadecyl group, and an icosyl group;

C6-C20 aryl groups, such as a phenyl group, a naphthyl group, an anthryl group, a phenanthryl group, a naphthacenyl group, a pyrenyl group, and the perylenyl group;

C7-C19 arylalkyl groups, such as a benzyl group, a phenethyl group, a diphenyl methyl group, a trityl radical, a tolyl group, a xylyl

ル基；ベンジル基、フェネチル基、ジフェニルメチル基、トリチル基、トリル基、キシリル基、クメニル基、メシチル基等の炭素数7～19のアリールアルキル基があげられる。R¹とR²とは同一でも異なってもよい。

【0008】

一般式(1)で表わされる本発明のウミホタルルシフェリン誘導体を後述の糖加水分解酵素の発光基質として利用する場合は、R¹またはR²は水素原子、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、t-ブチル基、フェニル基、ナフチル基、ベンジル基またはフェネチル基であるのが好ましい。

【0009】

一般式(1)においてR³で示される基の具体的なものとしては、例えばメチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、t-ブチル基、ペンチル基等の直鎖状または分岐鎖状の炭素数1～5のアルキル基；メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、イソプロポキシ基、n-ブトキシ基、イソブトキシ基、t-ブトキシ基等の炭素数1～5のアルコキシ基があげら

group, a cumenyl group, and a mesityl group, are mentioned.

R¹ and R² may be same or different.

[0008]

When the cypridina-luciferin derivative of this invention expressed with General formula (1) is utilized as a luminescence matrix of the below-mentioned saccharide hydrolase, as for R¹ or R², it is desirable that they are a hydrogen atom, a methyl group, an ethyl group, n-propyl group, an isopropyl group, n-butyl group, an isobutyl group, t-butyl group, a phenyl group, a naphthyl group, a benzyl group, or a phenethyl group.

[0009]

As a specific thing of the group shown by R³ in General formula (1), it is an alkyl group of the linear or branched carbon charcoal 1-5, such as a methyl group, an ethyl group, n-propyl group, an isopropyl group, n-butyl group, an isobutyl group, t-butyl group, and a pentyl group, for example.;

C1-C5 alkoxy groups, such as a methoxy group, an ethoxy group, n-propoxy group, an isopropoxy group, n-butoxy group, an isobutoxy group, and t-butoxy group, are mentioned.

What position may be sufficient as the position

れる。これらの基がベンゼン環に結合する位置はどこの位置でもよく、またその数（ n の数）は0～5である。

which these groups connect with a benzene ring?

Moreover, the number (the number of n) is 0-5.

【0010】

一般式（1）で表わされる本発明のウミホタルルシフェリン誘導体を後述の糖加水分解酵素の発光基質として利用する場合は、 R^3 はメチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基、 n -ブチル基、イソブチル基、 t -ブチル基、メトキシ基、エトキシ基、 n -プロポキシ基、イソプロポキシ基、 n -ブトキシ基、イソブトキシ基または t -ブトキシ基であって、ベンゼン環の4位に1個、2および4位に2個、または2、4および6位に3個結合しているのが好ましい。

[0010]

When the cypridina-luciferin derivative of this invention expressed with General formula (1) is utilized as a luminescence matrix of the below-mentioned saccharide hydrolase, r^3 is a methyl group, an ethyl group, n -propyl group, an isopropyl group, n -butyl group, an isobutyl group, t -butyl group, a methoxy group, an ethoxy group, n -propoxy group, an isopropoxy group, n -butoxy group, an isobutoxy group, or t -butoxy group, comprised such that it is desirable to connect with one piece two at 4-position of a benzene ring, and to have connected with 4-position at two pieces or 2 and 4, and three 6-position.

【0011】

一般式（2）における R^4 のアシル基としては、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、バレリル基、ベンゾイル基などの炭素数1～7のアシル基があげられる。一般式（2）における R^1 、 R^2 、 R^3 および n は前記と同じものを示す。

[0011]

As an acyl group of R^4 in General formula (2), C1-C7 acyl groups, such as an acetyl group, a propionyl group, a butyryl group, an isobutyryl group, a valeryl group, and a benzoyl, are mentioned.

R^1 in General formula (2), R^2 , R^3 , and n show the same thing as the above.

【0012】

一般式（1）で表わされる本発

[0012]

Cypridina-luciferin derivative of this invention

明のウミホタルルシフェリン誘導体は、一般式(3)で表わされるイミダゾピラジン誘導体と、一般式(4)で表わされる糖誘導体とを、トリフルオロメタンスルホン酸銀およびリン酸二ナトリウム塩の存在下に反応させて一般式(2)で表わされるウミホタルルシフェリン中間体(以下、単に中間体という場合がある)を製造した後、この中間体をアルカリ存在下に加溶媒分解することにより製造できる。

expressed with General formula (1), the imidazo pyrazine derivative expressed with General formula (3), and the sugar derivative object expressed with General formula (4), after manufacturing the cypridina-luciferin intermediate (it may only call it an intermediate hereafter) which makes react in the presence of trifluoro methanesulfonic acid silver and phosphoric-acid disodium salt, and is expressed with General formula (2), it can manufacture by carrying out the solvolysis of this intermediate in the presence of an alkali.

【0013】

一般式(3)における R^1 、 R^2 、 R^3 および n は前記と同じものを示す。一般式(4)における X で示されるハロゲン原子としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等があげられる。 R^4 は前記と同じものを示すが、アセチル基またはベンゾイル基が好ましい。一般式(4)で表わされる糖誘導体の糖骨格としては、 α -D-ガラクトピラノース、 β -D-ガラクトピラノース、 α -D-グルコピラノースおよび β -D-グルコピラノースがあげられる。

[0013]

R^1 in General formula (3), R^2 , R^3 , and n show the same thing as the above.

As a halogen atom shown by X in General formula (4), a fluorine atom, a chlorine atom, a bromine atom, an iodine atom, etc. are mentioned.

R^4 shows the same thing as the above.

However, an acetyl group or a benzoyl is desirable.

The (alpha)-D-galactopyranose, the (beta)-D-galactopyranose, the (alpha)-D-glucopyranose, and the (beta)-D-glucopyranose are mentioned as a saccharide skeleton of the sugar derivative object expressed with General formula (4).

【0014】

一般式(3)のイミダゾピラジン誘導体と一般式(4)の糖誘導体との仕込み割合は、イミダ

[0014]

The preparation ratio of the imidazo pyrazine derivative of General formula (3) and the sugar derivative object of General formula (4) is the

ゾピラジン誘導体：糖誘導体のモル比で1：0.1～1：100、好ましくは1：1～1：100とするのが望ましい。このモル比が0.1未満の場合には生成する中間体の収率が低下する傾向にあり、一方100を超えると反応終了後に未反応の糖誘導体が残存し、目的とする生成物の単離が困難となるので好ましくない。

【0015】

トリフルオロメタンスルホン酸銀の使用量は、糖誘導体：トリフルオロメタンスルホン酸銀の仕込みモル比で1：0.1～1：100、好ましくは1：1～1：20とするのが望ましい。またリン酸二ナトリウム塩の使用量は、イミダゾピラジン誘導体：リン酸二ナトリウム塩の仕込みモル比で1：0.1～1：100、好ましくは1：1～1：50とするのが望ましい。なお、トリフルオロメタンスルホン酸銀は触媒として、またリン酸二ナトリウム塩はイミダゾピラジン誘導体の活性を上げるために用いられる。

【0016】

反応溶媒としては、反応条件下で不活性であり、かつ生成した中間体からの分離が容易なもの

molar ratio of an imidazo pyrazine derivative:sugar derivative object, and is 1:0.1-1:100, it is desirable to be referred to as 1:1-1:10 preferably.

When this molar ratio is less than 0.1, it is in the trend for the yield of the intermediate to form to fall.

On the other hand, if 100 is exceeded, a unreacted sugar derivative object remains after the completion of reaction, since an isolation of the target product becomes difficult, it is not desirable.

[0015]

The amount of the trifluoro methanesulfonic acid silver used is the preparation molar ratio of sugar derivative object:trifluoro methanesulfonic acid silver, and is 1:0.1-1:100, it is desirable to be referred to as 1:1-1:20 preferably.

Moreover, the amount of the phosphoric-acid disodium salt used is the preparation molar ratio of imidazo pyrazine derivative:phosphoric-acid disodium salt, and is 1:0.1-1:100, it is desirable to be referred to as 1:1-1:50 preferably.

In addition, as a catalyst, trifluoro methanesulfonic acid silver is used, in order that phosphoric-acid disodium salt may raise the activity of the imidazo pyrazine derivative.

[0016]

As reaction solvent, it is inactive on reaction conditions.

And if the separation from the formed

であるならばどのような溶媒でも使用できる。このような溶媒としては、アセトニトリル、ベンゼン、トルエン、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドあるいはこれらの混合溶媒などが適当である。使用する溶媒の量は特に限定されないが、出発物質の総重量あたり1～1000倍量であることが好ましい。また反応をさらに円滑に進めるために、脱水溶媒を用いることが好ましい。さらに反応系から水分を除去するために、反応条件下で不活性な吸湿剤、例えばモレキュラーシーブなどを反応系内に存在させることが好ましい。吸湿剤の仕込み量としては、出発物質の総重量あたり1～1000倍量とするのが好ましい。

【0017】

反応温度は、通常-20～+150℃、好ましくは-10～+100℃とするのが望ましい。反応は減圧または加圧下に行うこともできるが、常圧で行うのが好ましい。反応時間は、通常30分間～20時間の範囲で行うことができるが、実用的には1～10時間になるように条件を設定するのが望ましい。また反応は不活性ガス雰囲気下に行うのが好ましい。

intermediate is easy, it can use any solvent.

As such solvent, the acetonitrile, benzene, toluene, tetrahydrofuran, a dioxane, a dimethylformamide, dimethyl sulfoxide, or these mixed solvents are suitable.

Although the quantity in particular of the solvent to be used is not limited, it is desirable that it is 1 to 1000 times the amount per total weight of a starting material.

Moreover, in order to advance reaction further smoothly, it is desirable to use the dehydration solvent.

Furthermore, in order to eliminate a water component from a reaction system, it is desirable to make an inactive moisture absorbent, for example, a molecular sieve etc., exist in a reaction system on reaction conditions.

As an amount of preparations of a moisture absorbent, it is desirable to consider it as 1 to 1000 times the amount per total weight of a starting material.

[0017]

Reaction temperature is usually -20-+150 degree C, it is desirable to consider it as -10-+100 degree C preferably.

It can also perform reaction under a pressure reduction or pressurization.

However, it is desirable to carry out by a normal pressure.

It can usually perform the reaction time in - 20 hours during 30 minutes.

However, it is desirable to set up conditions become in 1 to 10 hours practical.

Moreover, it is desirable to carry out reaction to

inert-gas atmosphere.

【0018】

このようにして反応を行うことにより、一般式(2)で表わされる中間体を得られる。この中間体から最終目的物である一般式(1)のウミホタルルシフェリン誘導体を得るには、反応液からクロマトグラフィーなどの方法により中間体を単離した後、得られた中間体をアルカリ存在下に加溶媒分解して脱保護基化することにより得ることができる。溶媒としては、水；メタノール、エタノール等の低級アルコール；これらの混合液などが使用できる。

[0018]

Thus, by performing reaction, the intermediate expressed with General formula (2) is obtained. In order to obtain the cypridina-luciferin derivative of General formula (1) which is the last objective substance from this intermediate, after isolating an intermediate by procedure, such as a chromatography, from a reaction mixture, it can obtain by carrying out the solvolysis of the obtained intermediate and forming it into the de-protection group in the presence of an alkali.

As solvent, it is water.;

Lower alcohols, such as methanol and ethanol;

It can use these mixed liquids etc.

【0019】

アルカリとしてはアンモニア、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、トリエチルアミン、グアニジン、1,8-ジアザビスクロ[5.4.0]ウンデセンなどが使用できる。アルカリの使用量は、反応液中の濃度が0.001~5N、好ましくは0.01~1Nとなる量で使用するのが望ましい。加溶媒分解は-50~+100℃、好ましくは0~+80℃で、0.1~24時間、好ましくは0.1~10時間行うのが望ましい。

[0019]

As an alkali, it can use ammonia, potassium carbonate, the sodium carbonate, the sodium hydroxide, potassium hydroxide, a triethylamine, a guanidine, a 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undecene, etc.

The amount of the alkali used is density 0.001-5N in a reaction mixture, it is desirable to use it in the quantity preferably set to 0.01-1N.

The solvolysis is -50-+100 degree C, preferably it is 0 - +80 degrees C, and is 0.1 to 24 hours, it is desirable to carry out preferably for 0.1 to 10 hours.

【0020】

反応終了後は、クロマトグラフィー、再結晶等の通常的手段により精製することができる。このようにして得られた一般式(1)で表わされるウミホタルルシフェリン誘導体は、 α -D-ガラクトシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、 α -D-グルコシダーゼまたは β -D-グルコシダーゼの糖加水分解酵素の基質として使用して発光させることができ、これらの糖加水分解酵素の定量試薬として利用することができる。糖加水分解酵素としては、抗体または抗原に化学的に結合している酵素を用いることもでき、この場合は化学発光酵素イムノアッセイ用の定量試薬として利用できる。

【0021】

糖加水分解酵素の定量は、反応媒体中で一般式(1)のウミホタルルシフェリン誘導体と糖加水分解酵素とを接触させ、このとき発光する発光量を測定し、予め作成した検量線を基に定量することができる。ウミホタルルシフェリン誘導体の使用量は、測定試料中に存在する糖加水分解酵素1モルに対して、通常 $1 \sim 10^{18}$ モル、好ましくは $10^3 \sim 10^{15}$ モルとするのが望ましい。

[0020]

The usual means, such as a chromatography and recrystallization, can purify after the completion of reaction.

Thus, cypridina-luciferin derivative expressed with obtained General formula (1), a (alpha)-D-galactosidase, a (beta)-D-galactosidase, it uses it as a matrix of the saccharide hydrolase of (alpha)-D-glucosidases or (beta)-D-glucosidases, and it can make light emit and can utilize as assay test of these saccharide hydrolases.

As a saccharide hydrolase, it can also use the enzyme which it has connected with the antibody or the antigen chemically, and can utilize as assay test for chemoluminescence enzyme immunoassays in this case.

[0021]

The assay of a saccharide hydrolase contacts the cypridina-luciferin derivative and saccharide hydrolase of General formula (1) in a reaction medium.

It measures the amount of luminescence which emits light at this time, it can assay based on the analytical curve created beforehand.

The amount of the cypridina-luciferin derivative used is usually a $1 \sim 10^{18}$ mole to 1 mol of saccharide hydrolases which exist in a measurement sample, it is desirable to consider it as a $10^3 \sim 10^{15}$ mole preferably.

【0022】

反応媒体としては、通常pH4～10、好ましくは定量する糖加水分解酵素の活性が高く維持されるpH値を有する水溶液または緩衝液などが使用できる。このような水溶液または緩衝液としては、例えば酢酸、炭酸、リン酸、ホウ酸水溶液；酢酸ナトリウム緩衝液、トリスアミノヒドロキシメタン緩衝液、コハク酸緩衝液、2-ヒドロキシ-1,2,3-プロパンカルボン酸緩衝液、モノフタル酸カリウム緩衝液、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸緩衝液、リン酸ナトリウム緩衝液、リン酸カリウム緩衝液、炭酸水素ナトリウム緩衝液、イミダゾール緩衝液等をあげることができ、使用に際しては単独もしくは混合物として用いることができる。

【0023】

反応を行う際の温度は、通常0～70℃、好ましくは15～60℃の範囲であることが望ましい。この温度範囲以外では、酵素の活性が低下するので好ましくない。このようにして反応させることによって、糖加水分解酵素の作用によりウミホタルルシフェリンが分解されて発光する。発光量は市販の光電子増倍管を備えた化学発光測定器など

[0022]

As a reaction medium, it is usually pH4-10, it can use an aqueous solution or buffer etc. with which the activity of the saccharide hydrolase which it preferably assays has pH value maintained highly.

As such an aqueous solution or buffer, they are an acetic acid, carbonic acid, the phosphoric acid, and a boric-acid aqueous solution, for example.;

Sodium-acetate buffer, tris aminohydroxy methane buffer, succinic-acid buffer, 2-hydroxy -1,2,3-propane carboxylic acid buffer, mono-phthalic-acid potassium buffer, it can mention 2-(N-morpholino) ethane-sulfonic-acid buffer, sodium-phosphate buffer, potassium phosphate buffer, sodium-hydrogen buffer, imidazole buffer, etc., and when it is use, it can use as by itself or a blend.

[0023]

The temperature at the time of performing reaction is usually 0 - 70 degrees C, it is desirable that it is preferably the range of 15 - 60 degrees C.

Since the activity of an enzyme falls except this temperature range, it is not desirable.

Thus, by making it react, a cypridina luciferin is degraded by effect of a saccharide hydrolase and it emits light.

It can perform the amount of luminescence easily by using the chemoluminescence

を用いることにより容易に行うことができる。 measuring device equipped with the commercial photomultiplier etc.

【0024】

このような本発明の糖加水分解酵素の定量方法は、基質として化学的に安定な前記ウミホタルルシフェリン誘導体を使用しているため、分析誤差を生じることなく、高い精度で酵素量を定量することができる。

[0024]

The quantitative method of such a saccharide hydrolase of this invention is using said cypridina-luciferin derivative chemically stable as a matrix, depend.

It can assay the amount of enzymes in high accuracy, without producing an analytical error.

【0025】**【発明の効果】**

本発明のウミホタルルシフェリン誘導体は新規であり、糖加水分解酵素の発光基質として有用である。本発明のウミホタルルシフェリン中間体は新規であり、上記のウミホタルルシフェリン誘導体の中間体として有用である。本発明のウミホタルルシフェリン誘導体の製造方法は、一般式（3）で表わされるイミダゾピラジン誘導体および一般式（4）で表わされる糖誘導体を出発物質として用い、これらをトリフルオロメタンスルホン酸銀およびリン酸二ナトリウム塩の存在下に反応させた後、得られた中間体を加溶媒分解するようにしたので、上記ウミホタルルシフェリン誘導体を簡単に効率よく製造することができる。また本発明のウミホタル

[0025]**[ADVANTAGE OF THE INVENTION]**

The cypridina-luciferin derivative of this invention is new.

It is useful as a luminescence matrix of a saccharide hydrolase.

The cypridina-luciferin intermediate of this invention is new.

It is useful as an intermediate of the above-mentioned cypridina-luciferin derivative.

The manufacturing method of the cypridina-luciferin derivative of this invention, after making these react in the presence of trifluoro methanesulfonic acid silver and phosphoric-acid disodium salt, using the sugar derivative object expressed with the imidazo pyrazine derivative and General formula (4) which are expressed with General formula (3) as a starting material, it was made to carry out the solvolysis of the obtained intermediate, depend.

It can manufacture the above-mentioned cypridina-luciferin derivative efficiently easily.

ルルシフェリン誘導体の中間体の製造方法も、一般式(3)で表わされるイミダゾピラジン誘導体および一般式(4)で表わされる糖誘導体を出発物質として用い、これらをトリフルオロメタンスルホン酸銀およびリン酸二ナトリウム塩の存在下に反応させるようにしたので、上記ウミホタルルシフェリン誘導体の中間体を簡単に効率よく製造することができる。本発明の糖加水分解酵素の定量方法は、基質として上記ウミホタルルシフェリン誘導体を使用しているので、高い精度で定量することができる。

Moreover, also the manufacturing method of the intermediate of the cypridina-luciferin derivative of this invention, it made it make these react in the presence of trifluoro methanesulfonic acid silver and phosphoric-acid disodium salt, using the sugar derivative object expressed with the imidazo pyrazine derivative and General formula (4) which are expressed with General formula (3) as a starting material.

Depend.

It can manufacture the intermediate of the above-mentioned cypridina-luciferin derivative efficiently easily.

The quantitative method of the saccharide hydrolase of this invention is using the above-mentioned cypridina-luciferin derivative as a matrix, depend.

It can assay in high accuracy.

【0026】

[0026]

【実施例】

以下、本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[EXAMPLES]

Hereafter, based on an Example, it demonstrates this invention concretely.

This invention is not limited to these.

【実施例1-1】

6-(4-メトキシフェニル)-2-メチルイミダゾ[1,2-a]ピラジン-3-オン(一般式(3)の R^1 はメチル基、 R^2 は水素原子、 R^3 はメトキシ基、 n は1) 0.1g (0.35 mmol) とリン酸二ナトリウム 1.1g (7.75 mmol)

[EXAMPLE 1-1]

After 5 ml of acetonitrile and 9 ml of benzene were added into a blend which includes 0.1g (0.35 mmol) of 6-(4-methoxyphenyl)-2-methylimidazo [1,2-a] pyrazine-3-on (In General formula (3), R^1 of is a methyl group, R^2 is a hydrogen atom and R^3 is a methoxy group, n is 1) and 1.1g (7.75 mmol) of phosphoric-acid disodium, it added 2.6g of molecular sieves 4A,

との混合物中に、アセトニトリル 5 ml およびベンゼン 9 ml を加えた後、モレキュラーシーブ 4 A を 2.6 g 加え、室温で 1 時間攪拌した。続いて 2, 3, 4, 6-テトラ- α -D-ガラクトピラノシルブロミド (一般式 (4) の X は臭素原子、R⁴ はアセチル基) 0.18 g (0.45 mmol) およびトリフルオロメタンスルホン酸銀 0.37 g (1.43 mmol) を加えて、窒素雰囲気下に室温で 2 時間攪拌し、6-(4-メトキシフェニル)-2-メチルイミダゾ[1, 2-a]ピラジン-3-オンと 2, 3, 4, 6-テトラ- α -D-ガラクトピラノシルブロミドとを反応させた。

【0027】

反応終了後、セライトを敷いたガラスフィルターにより反応溶液を濾過した後、残渣をアセトニトリルおよびベンゼンで洗浄した。濾液および洗液の混合液から溶媒を留去し、次に塩化メチレン 15 ml および飽和炭酸水素ナトリウム-食塩水 10 ml を加えて攪拌した後、不溶物をガラスフィルターにより取り除いた。次に塩化メチレン層を分取した後、硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶媒を留去後、得られた油状物をシリカゲルカ

and churned them at room temperature for 1 hour.

Then, it added 0.18g (0.45 mmol) of a 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosyl bromide (In General formula (4), X is a bromine atom, R⁴ is a acetyl group.) and 0.37g (1.43 mmol) of trifluoro methanesulfonic acid silver, and churned at room temperature in nitrogen atmosphere for 2 hours.

It made 6-(4-methoxyphenyl)-2-methyl imidazo [1,2-a] pyrazine-3-on and a 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosyl bromide react.

[0027]

After the completion of reaction, after filtrating a reaction solution with a glass filter which is covered with cerite, it cleaned the residue with acetonitrile and benzene.

It distills the solvent from the mixed liquid of filtrate and wash liquid, next, after adding and churning 15 ml of methylene chlorides and 10 ml of saturated hydrogen-carbonate sodium-salt solution, it removed insoluble matters with the glass filter.

Next, after batching off a methylene-chloride layer, it dried with a sodium sulfate.

When a silica-gel column (30% acetone-benzene) and medium-voltage column

ラム (30%アセトン-ベンゼン) および中圧カラムクロマトグラフィーにより精製すると、中間体である 6-(4-メトキシフェニル)-2-メチル-3-(テトラ-O-アセチル-β-D-ガラクトピラノシルオキシ)イミダゾ[1,2-a]ピラジン (一般式(2)の R¹はメチル基、R²は水素原子、R³はメトキシ基、nは1、R⁴はアセチル基) が収量 0.08 g (0.14 mmol)、収率 39% で得られた。

chromatography purify the obtained oily substance after distilling the solvent, the 6-(4-methoxyphenyl)-2-methyl-3-(tetra-O-acetyl-(beta)-D-galactopyranosyl oxy)imidazo[1,2-a]pyrazine (In General formula (2), R¹ is a methyl group, R² is a hydrogen atom, R³ is a methoxy group, n is 1, R⁴ is an acetyl group), which is an intermediate, was obtained with the yield point of 0.08g (0.14 mmol) and the yield constant of 39%.

【0028】

スペクトルデータは次の通りである。

MS (FAB: m/Z): 586 (M+H)⁺, 256

Exact MS: 586.1995

C₂₈H₃₂O₁₁N₃ の計算値: 586.2037

[0028]

The spectrum data are as follows.

MS(FAB:m/Z):586(M+H)⁺,256

Exact MS:586.1995

The calculated value of C₂₈H₃₂O₁₁N₃: 586.2037

IR (KBr: cm⁻¹): 3450, 2970, 2940, 1745, 1605, 1560, 1495, 1370, 1245, 1225, 1060, 1035

¹H-NMR (CDCl₃/TMS: δ (ppm)): 1.73(3H, s, CH₃CO), 2.05(3H, s, CH₃CO), 2.21(3H, s, CH₃CO), 2.27(3H, s, CH₃CO), 2.47(3H, s, CH₃CO), 3.88(3H, s, CH₃O), 3.93(1H, dd, J=6.4, 5.9Hz), 4.11(1H, dd, J=11.4, 6.9Hz), 4.18(1H, dd, J=11.4, 5.9Hz), 4.89(1H, d, J=7.9Hz), 5.10(1H, d, J=10.4, 3.5Hz), 5.45(1H, d, J=10.6, 8.2Hz), 7.02(2H,

IR(KBr:cm⁻¹): 3450, 2970, 2940, 1745, 1605, 1560, 1495, 1370, 1245, 1225, 1060, 1035

¹H-NMR

(CDCl₃/TMS:(delta) (ppm)) :1.73(3H, s, CH₃CO), 2.05(3H, s, CH₃CO), 2.21(3H, s, CH₃CO), 2.27 (3H, s, CH₃CO), 2.47(3H, s, CH₃CO), 3.88(3H, s, CH₃O), 3.93 (1H, dd, J= 6.4, 5.9Hz), 4.11(1H, dd, J=11.4, 6.9Hz), 4.18(1H, dd, J=11.4, 5.9Hz), 4.89(1H, d, J=7.9Hz), 5.10(1H, d, J=10.4, 3.5Hz), 5.45(1H, d, J=10.6, 8.2Hz), 7.02(2H,

5.9Hz), 4.11(1H, dd, J=11.4, A2'X2', J=8.9Hz), 7.86(2H, A2'X2',
 6.9Hz), 4.18(1H, dd, J=11.4, J=8.9Hz), 8.34(1H, d, J=1.5Hz), 8.94(1H, d, J
 5.9Hz), 4.89(1H, d, =1.5Hz)
 J=7.9Hz), 5.10(1H, dd, J=10.4,
 3.5Hz), 5.45(1H, d,
 J=2.5Hz), 5.62(1H, dd, J=10.6,
 8.2Hz), 7.02(2H, A2'X2',
 J=8.9Hz), 7.86(2H, A2'X2',
 J=8.9Hz), 8.34(1H, d, J=1.5Hz),
 8.94(1H, d, J=1.5Hz)

【0029】

実施例 1-2

実施例 1-1 で得られた中間体
 0.05 g (0.09 mmol)
 にメタノール 3.5 ml および
 濃アンモニア水 1.8 ml を加
 えた後、40℃で6時間30分
 攪拌して加溶媒分解した。白色
 沈澱を濾取し、メタノールから
 再結晶を行うと目的の 3- (β
 -D-ガラクトピラノシルオキシ
 シ)-6-(4-メトキシフェ
 ニル)-2-メチルイミダゾ
 [1,2-a]ピラジン (一般
 式 (1) の R¹ はメチル基、R²
 は水素原子、R³ はメトキシ基、
 n は 1) が収量 0.03 g (0.
 07 mmol)、収率 78% で得
 られた。

【0030】

スペクトルデータは次の通りで
 ある。
 MS (FAB: m/Z): 418
 (M+H)⁺

[0029]

Example 1-2

After adding methanol 3.5 ml and 1.8 ml of
 concentrated-ammonia water to 0.05g (0.09
 mmol) of intermediates obtained in Example
 1-1, at 40 degrees C, it agitated for 6 hours and
 30 minutes, and carried out the solvolysis.
 It filters white precipitation, when
 recrystallization is performed from methanol, it
 is the target 3-((beta)-D-galactopyranosyl
 oxy)-6-(4-methoxyphenyl)-2-methyl imidazo
 [1,2-a] pyrazine (R¹ of General formula (1) is a
 methyl group).

Obtained R² with the hydrogen atom, R³ was
 obtained by the methoxy group, and, as for n, 1
 was obtained with the yield of 0.03g (0.07
 mmol), and 78% of the yield.

[0030]

The spectrum data are as follows.

MS(FAB: m/Z): 418(M+H)⁺

Exact MS: 418.1555

The calculated value of C₂₀H₂₄O₇N₃: 418.1614

Exact MS : 418.1555

C₂₀H₂₄O₇N₃ の計算値 : 418.1614

IR (KBr : cm⁻¹) : 3450, IR(KBr:cm⁻¹): 3450, 2930, 2880, 1605, 1565, 2930, 2880, 1605, 1565, 1490, 1405, 1240, 1090, 1080, 1010
1490,1405, 1240, 1090, 1080, IR(KBr:cm⁻¹): 3450, 2975, 2950, 1745, 1605, 1010, 1555, 1495, 1365, 1225, 1075, 1035

IR (KBr : cm⁻¹) : 3450, ¹H-NMR(DMSO-d₆/TMS:(delta) (ppm)): 2975, 2950, 1745, 1605, 2.41(3H, s, CH₃), 3.3-3.73 (3H, m), 3.82(3H, s, CH₃O, 4.59-4.68 (2H, m), 4.97(1H, d, J=5.4Hz), 5.78(1H, d, J=5.4Hz), 7.06(2H, A2'X2', J=8.9Hz), 7.95(2H, A2'X2', J=8.9Hz), 8.77(1H, d, J=1.5Hz), 8.94(1H, d, J=1.5Hz)
¹H-NMR (DMSO-d₆/TMS : δ (ppm)) : 2.41(3H, s, CH₃), 3.3 ~ 3.73(3H, m), 3.82(3H, s, CH₃O), 4.59 ~ 4.68(2H, m), 4.97(1H, d, J=5.4Hz), 5.78(1H, d, J=5.4Hz), 7.06(2H, A2'X2', J=8.9Hz), 7.95(2H, A2'X2', J=8.9Hz), 8.77(1H, d, J=1.5Hz), 8.94(1H, d, J=1.5Hz)

【0031】

実施例 1-3

実施例 1-1 で用いた糖誘導体の代わりに 2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル-α-D-グルコピラノシルブロミド 0.17g (0.41 mmol) を用いた以外は、実施例 1-1 と同様に反応を行うと、β体のみが収量 0.03g (0.05 mmol)、収率 16% で得られた。

[0031]

Example 1-3

Except for having used the 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-(alpha)-D-glucopyranosyl bromide 0.17g (0.41 mmol) instead of the sugar derivative object used in Example 1-1, when reaction was performed like Example 1-1, only the (beta)-isomer was obtained with the yield of 0.03g (0.05 mmol), and 16% of the yield.

【0032】

スペクトルデータは次の通りである。

MS (FAB:m/Z): 586

(M+H)⁺, 256

Exact MS: 586.2

023

C₂₈H₃₂O₁₁N₃ の計算値: 58

6.2037

[0032]

The spectrum data are as follows.

MS(FAB:m/Z):586(M+H)⁺,256

Exact MS:586.2023

The calculated value of C₂₈H₃₂O₁₁N₃: 586.2037

IR (KBr:cm⁻¹): 3450, 2975, 2950, 1745, 1605, 1555, 1495, 1365, 1225, 1075, 1035

IR(KBr:cm⁻¹): 3450, 2975, 2950, 1745, 1605, 1555, 1495, 1365, 1225, 1075, 1035

¹H-NMR (CDCl₃/TMS:(delta) (ppm)) :1.82(3H, s,

CH₃CO), 2.04(3H, s, CH₃CO),2.06(3H, s,

S:δ(ppm)): 1.82(3H, s, CH₃CO), 2.18 (3H, s, CH₃CO),2.46(3H, s, CH₃),

CH₃CO), 2.04(3H, s, CH₃CO),2.06(3H, s, CH₃CO), 3.70 (1H, ddd, J= 9.6, 2.5, 2.0Hz),3.87(3H, s,

CH₃CO),2.06(3H, s, CH₃CO), CH₃O, 4.06 (1H, dd, J= 12.4, 2.0Hz), 4.24(1H,

2.18(3H, s, CH₃CO),2.46(3H, s, CH₃),3.70(1H, ddd, J=9.6, 2.5, 2.0Hz),3.87(3H, s,

CH₃O),4.06(1H, dd, J=12.4, 2.0Hz),4.24(1H, dd, J=12.6, 5.7Hz),4.94(1H, d, J=7.9Hz),

5.19(1H, t, J=9.7Hz),5.29(1H, t, J=9.4Hz),

5.42(1H, t, J=8.7, 7.9Hz),6.99(2H, A2'X2',

J=8.9Hz),7.86(2H, A2'X2', J=8.9Hz),8.33(1H, d,

J=1.5Hz),8.94(1H, broad s)

5.7Hz),4.94(1H, d, J=7.9Hz),5.19(1H, t,

J=9.7Hz),5.29(1H, t, J=9.4Hz),5.42(1H, t, J=8.7,

7.9Hz),6.99(2H, A2'X2', J=8.9Hz),7.86(2H, A2'X2',

J=8.9Hz),8.33(1H, d, J=1.5Hz),8.94(1H, broad s)

J=8.9Hz),8.33(1H, d, J=1.5Hz),8.94(1H, broad s)

J=1.5Hz),8.94(1H, broad s)

J=1.5Hz),8.94(1H, broad s)

J=1.5Hz),8.94(1H, broad s)

【0033】

実施例 2-1

1 mM MgCl₂を含む0.1

[0033]

Example 2-1

To 0.1M tris hydrochloric-acid buffer (pH8.0)

Mトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 650 μ l に、1 mM MgCl₂ 650 microliter containing 1 mM MgCl₂
 g C l₂ を含む 50 mM リン酸 1 mM MgCl₂
 緩衝液 (pH 7.3) で希釈さ Included 50-mM phosphate buffer
 れた β -D-ガラクトシダーゼ It diluted at (pH 7.3).
 水溶液 25 μ l および実施例 1 100 micronM 3-((β)-D-galactopyranosyl
 -2 で得られた 100 μ M 3 oxy)-6-(4-methoxyphenyl)-2-methyl imidazo [1
 - (β -D-ガラクトピラノシ obtained in (β)-D-galactosidase aqueous
 ルオキシ) -6- (4-メトキ solution 25 microliter and Example 1-2, 2-a) It
 シフェニル) -2-メチルイミ added dimethyl-sulfoxide solution 75 microliter
 ダゾ [1, 2-a] ピラジンの of the pyrazine, and incubated for 20 minutes at
 ジメチルスルホキシド溶液 75 40 degrees C.
 μ l を加え、40 °C で 20 分間 It samples 500 microliter from a reaction
 インキュベートした。反応溶液 solution, it measured luminescence intensity for
 から 500 μ l をサンプリング 10 seconds by the chemoluminescence
 し、化学発光測定器 (東北電子 measuring device (northeast electronic
 産業社製, CLD-100、商 industrial company make, CLD-100, brand
 品名) により発光強度を 10 秒 name).
 間測定した。その結果を表 1 に The result is shown in Table 1.
 示す。

【0034】

[0034]

【表 1】

[TABLE 1]

表 1

酵素量 (mol/test)	log (酵素量)	発光量 (counts/10s)	log (発光量)
1.73×10^{-13}	-12.76	2.77×10^5	5.44
1.73×10^{-14}	-13.76	3.92×10^4	4.59
8.63×10^{-15}	-14.06	1.56×10^4	4.19
4.31×10^{-15}	-14.37	7.53×10^3	3.88
2.16×10^{-15}	-14.67	3.64×10^3	3.56
1.04×10^{-15}	-14.98	1.67×10^3	3.22
6.90×10^{-16}	-15.16	6.13×10^2	2.79

表 1: Table 1

酵素量: The amount of enzymes

発行量: The amount of luminescence

【 0 0 3 5 】

表 1 の結果から、酵素の量に応じた発光量が観察されたことがわかる。そして、 \log (酵素量, mol/test) と \log (発光量, $\text{counts}/10\text{s}$) との関係式は次式 (5)

【数 1】

$$\log (\text{発光量, counts}/10\text{s}) = 1.08 \times \log (\text{酵素量, mol/test}) + 19.27 \quad \dots (5)$$

相関係数 $r = 0.992$

[0035]

The result of Table 1 shows that the amount of luminescence according to the quantity of the enzyme was observed.

And the relation of \log (the amount of enzymes, mol/test) and \log (the amount of luminescence, $\text{counts} / 10\text{s}$) is the following Formula (1).

[EQUATION 1]

$$\log (\text{the amount of luminescence, counts} / 10\text{s}) = 1.08 * \log (\text{the amount of enzymes, mol/test}) + 19.27 \dots (5)$$

Correlation coefficient $r = 0.992$

で表わされるので、発光量により β -D-ガラクトシダーゼを定量することができることがわかる。従って、実施例のウミホタルルシフェリン誘導体は β -D-ガラクトシダーゼの化学発光基質として有用である。

It is expressed with these, depend.

It turns out that it can assay a (beta)-D-galactosidase with the amount of luminescence.

Therefore, the cypridina-luciferin derivative of an Example is useful as a chemoluminescence matrix of a (beta)-D-galactosidase.

THOMSON SCIENTIFIC TERMS AND CONDITIONS

Thomson Scientific Ltd shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Thomson Scientific translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.

Thomson Scientific Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our website:

["www.THOMSONDERWENT.COM"](http://www.THOMSONDERWENT.COM) (English)

["www.thomsonscientific.jp"](http://www.thomsonscientific.jp) (Japanese)